

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 196 17 011 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 196 17 011.7
㉑ Anmeldetag: 27. 4. 96
㉒ Offenlegungstag: 6. 11. 97

⑤1 Int. Cl.⁸:
H 01 J 49/16
G 01 N 1/28
G 01 N 27/62

24736

DE 196 17 011 A 1

㉑ Anmelder:
Bruker-Franzen Analytik GmbH, 28359 Bremen, DE

㉒ Erfinder:
Köster, Claus, 28865 Lilienthal, DE; Franzen, Jochen,
28359 Bremen, DE

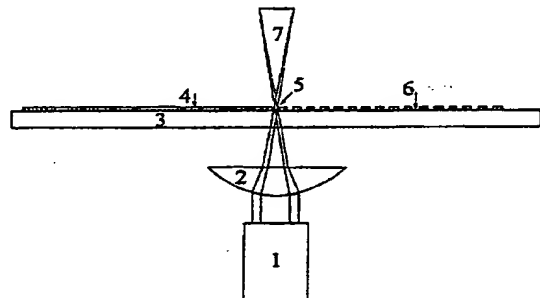
⑤6 Entgegenhaltungen:

DE	44 08 034 C1
DE	39 31 287 A1
US	53 08 978 A
US	51 18 937 A
WO	91 04 570 A1

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verfahren zur matrixunterstützten ionisierenden Laserdesorption

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur matrixunterstützten ionisierenden Laserdesorption großer Analytmoleküle (MALDI) im Vakuum für die Erzeugung von Ionen für die massenspektrometrische Untersuchung der Analytsubstanz. Die Erfindung besteht darin, die Matrixsubstanz für die Unterstützung der Desorption aus mindestens zwei verschiedenartigen Komponenten zu bilden, wobei eine Komponente eine Substanz sein soll, die einerseits sehr adsorptiv, aber andererseits thermolytisch in kleine Moleküle zersetzbar ist. Eine weitere Komponente übernimmt die Protonierung der Analytmoleküle. Besonders geeignet ist eine dünne Schicht aus Nitrozellulose (korrekter: Zellulosanitrat), in der eine protonierende Substanz eingebettet ist. Die in Wasser unlösliche Schicht adsorbiert die großen Analytmoleküle aus wässriger Lösung an ihrer Oberfläche.



DE 196 17 011 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen
BUNDESDRUCKEREI 09. 97 702 045/213

7/24

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur matrixunterstützten ionisierenden Laserdesorption großer Analytmoleküle (MALDI) im Vakuum für die Erzeugung von Ionen für die massenspektrometrische Untersuchung der Analytsubstanz.

Die Erfindung besteht darin, die Matrixsubstanz für die Unterstützung der Desorption aus mindestens zwei verschiedenartigen Komponenten zu bilden, wobei eine Komponente eine Substanz sein soll, die einerseits sehr adsorptiv, aber andererseits thermolytisch in kleine Moleküle zersetzbar ist. Eine weitere Komponente übernimmt die Protonierung der Analytmoleküle. Besonders geeignet ist eine dünne Schicht aus Nitrozellulose (korrekter: Zellosenitrat), in der eine protonierende Substanz eingebettet ist. Die in Wasser unlösliche Schicht adsorbiert die großen Analytmoleküle aus wässriger Lösung an ihrer Oberfläche.

Allgemeiner Stand der Technik

Das Verfahren der massenspektrometrischen Untersuchungen von großmolekularen Analytsubstanzen mit Ionisierung durch laserinduzierte Desorption besteht darin, den Probenträger mit oberflächlich aufgetragener Analytsubstanz einem Lichtpuls aus einem Laser auszusetzen, der auf die Probenoberfläche fokussiert wird. Dieser Lichtpuls erzeugt Ionen der Analytmoleküle, die dann mit ionenoptischen Mitteln der massenspektrometrischen Analyse zugeführt werden. Es finden dabei insbesondere Flugzeitmassenspektrometer, aber auch ionenspeichernde Massenspektrometer, wie Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfallen (häufig einfach "Ionenfallen" genannt) oder Ionen-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometer ("ICR-Spektrometer"), Anwendung.

Für den besonderen Fall der Flugzeitmassenspektrometrie wird der Probenträger konstant auf eine Hochspannung zwischen 6 und 30 Kilovolt gelegt, dem in einer Entfernung von 10 bis 20 Millimetern eine Grundelektrode auf Erdpotential gegenüberliegt. Ein Laserpuls von typischerweise etwa 4 Nanosekunden Dauer übernimmt die Ionisierung. Die Ionen werden durch das elektrische Feld zur Grundelektrode hin beschleunigt und erhalten dabei alle die gleiche kinetische Energie. Jenseits der Grundelektrode befindet sich die feldfreie Flugstrecke des Flugzeitmassenspektrometers. Am Ende der Flugstrecke werden die ankommenden Ionen detektiert, aus ihrer Flugzeit läßt sich — bei gleicher kinetischer Energie — ihre Masse bestimmen.

Bei Verwendung von ionenspeichernden Massenspektrometern wie Quadrupol-Ionenfallen oder ICR-Spektrometern werden die desorptiv erzeugten Ionen mit ionenoptischen Mitteln in die Speicherzellen der Massenspektrometer überführt und dort massenspektrometrisch untersucht.

Für die Ionisierung von großen Analytmolekülen durch die weithin bekannte matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI = matrix assisted laser desorption and ionization), die in den vergangenen Jahren eine große Verbreitung gefunden hat, werden die großen Moleküle der Analytsubstanz auf dem Probenträger in eine Schicht winziger Kristalle einer niedermolekularen Matrixsubstanz eingelagert. Der Laserlichtpuls verdampft praktisch momentan eine geringe Menge der Matrix-

substanz. Die Dampf Wolke nimmt zunächst praktisch den gleichen Raum ein wie die Festsubstanz, steht also unter hohem Druck. Auch die großen Analytmoleküle werden in die zunächst winzige Dampf Wolke überführt. Bei der Bildung der Dampf Wolke wird ein geringer Teil der Moleküle, und zwar sowohl der Matrix- wie auch der großen Analytmoleküle, ionisiert. Anschließend dehnt sich die Dampf Wolke in einem adiabatischen und isentropischen Prozeß ähnlich einer Explosion in das umgebende Vakuum aus. Solange während der Ausdehnung der Dampf Wolke noch Kontakt der Moleküle untereinander besteht, findet durch Ionen-Molekül-Reaktionen eine fortgesetzte Ionisierung der großen Analytmoleküle auf Kosten der kleineren Matrixionen statt.

Die ins Vakuum expandierende Dampf Wolke beschleunigt durch ihre adiabatische Ausdehnung nicht nur die Moleküle und Ionen der Matrixsubstanz, sondern durch viskose Mitnahme auch die Moleküle und Ionen der Analytsubstanz. Dehnt sich die Wolke in einem Raum aus, der frei von elektrischen Feldern ist, so erreichen die Ionen mittlere Geschwindigkeiten von etwa 700 Metern pro Sekunde; die Geschwindigkeiten sind dabei weitgehend unabhängig von der Masse der Ionen, haben aber eine große Geschwindigkeitsstreuung, die von etwa 200 bis zu 2000 Metern pro Sekunde reicht. Es ist anzunehmen, daß auch die neutralen Moleküle diese Geschwindigkeiten besitzen.

Die große Streuung der Anfangsgeschwindigkeiten bei laserinduzierter Ionisierung beeinträchtigt und begrenzt die Massenauflösung der Flugzeitmassenspektrometer; es gibt jedoch eine einfache Methode, die Ionen wieder zeitlich zu fokussieren und damit das Auflösungsvermögen zu verbessern. Das Prinzip dieser Methode ist einfach: Die Ionen der Wolke werden zunächst für eine kurze Zeit in einem feldfreien Raum ohne jede elektrische Beschleunigung fliegen gelassen. Die schnelleren Ionen entfernen sich dabei weiter von der Probenträgerelektrode als die langsamen, aus der Geschwindigkeitsverteilung der Ionen ergibt sich eine Ortsverteilung. Erst dann wird plötzlich die Beschleunigung der Ionen durch ein homogenes Beschleunigungsfeld, also einem Feld mit linear abfallendem Beschleunigungspotential, eingeschaltet. Die schnelleren Ionen befinden sich dann weiter von der Probenträgerelektrode entfernt, somit auf einem etwas geringeren Anfangspotential für die Beschleunigung, das ihnen eine etwas geringere Endgeschwindigkeit für die Driftstrecke des Flugzeitmassenspektrometers vermittelt als den zu Beginn langsameren Ionen. Bei richtiger Wahl der Zeitverzögerung für den Einsatz der Beschleunigung ("time lag") können die zu Beginn langsameren, aber nach Beschleunigung schnelleren Ionen die zu Beginn schnelleren, aber nach Beschleunigung langsameren Ionen genau am Detektor wieder einholen. Es werden somit Ionen gleicher Masse am Ort des Detektors in bezug auf die Flugzeit in erster Ordnung fokussiert.

Für die anderen genannten Arten der Massenspektrometrie ist die Streuung der Anfangsenergien ebenfalls schädlich, da sie den Einfangsprozeß der Ionen in den Speicherzellen erschwert. Hier ist noch keine Methode zur Verbesserung des Einfangs durch Homogenisierung der Anfangsenergien bekannt.

Nachteile bisheriger Verfahren

Die Ionisierung durch MALDI ist bisher nicht automatisierbar, weil noch keine gleichmäßige Verdampfung und Ionisierung erreicht werden konnte. Die Kri-

stallschicht der Matrixsubstanz wird gewöhnlich durch Eintrocknen eines Tröpfchens, in dem Matrix und eine geringe Menge des Analyts gleichzeitig gelöst sind, erhalten. Die Schicht gleicht einer wüst gewachsenen Großstadt, in der Areale mit Hochhäusern und solche mit kleinen Villen oder sogar Buden durcheinander angeordnet sind. Es ist daher Stand der Technik, die Schicht der Matrixkristalle mit einer videomikroskopischen Einrichtung zu beobachten, und visuell eine durch Erfahrung vielversprechende Stellen der Kristallschicht auszusuchen. Selbst bei einem solchen visuellen Ausschuchen geeigneter Stellen muß man immer noch probieren, bis man eine geeignete Stelle findet, die ein Spektrum genügender Intensität und Massenauflösung liefert. Nur für wenige Matrixsubstanzen sind andere Verfahren mit glatter Untergrundschicht aus Matrixsubstanz bekannt geworden, die etwas gleichmäßigere Ergebnisse liefern. Diese haben sich aber bisher nicht durchgesetzt, weil diese Matrixsubstanzen nur für ausgesuchte Analytsubstanzen einsetzbar sind.

Es ist nämlich bisher nicht einmal vorhersagbar, welcher Analyt mit welcher Matrix erfolgreich zusammengebracht werden kann. Matrixsubstanzen nehmen manche Analytmoleküle nicht in die Kristalle auf, in anderen Fällen sind Matrixsubstanzen nicht für die Ionisierung der Analytmoleküle geeignet. Auch hier ist immer wieder Probieren angesagt. Eine Automatisierung braucht aber ein Ionisierungsverfahren, das unabhängig von der Art der Analytsubstanzen regelmäßig zufriedenstellend arbeitet. Ein solches Verfahren wurde bisher noch nicht gefunden.

Aufgabe der Erfindung

Es ist die grundsätzliche Aufgabe der Erfindung, das MALDI-Verfahren so abzuwandeln, daß eine automatisierbare Probenvorbereitung und automatisierbare Ionisierung erreicht wird. Im besonderen muß die Probe ohne experimentelle Suche nach der besten Matrixsubstanz automatisch auf den Probenträger aufgebracht werden können. Sie muß ferner blind und ohne Suche nach einem optimalen Beschußpunkt der Laserstrahlung ausgesetzt werden können und dabei eine für Spektrenintensität und Massenauflösung optimale Ionenbildung erreichen. Für die Flugzeitmassenspektrometrie soll insbesondere eine gleichmäßige Wolkenbildung erreicht werden, die günstige Voraussetzungen für die verbesserte Fokussierung durch verzögerte Beschleunigung schafft. Insgesamt soll das Verfahren eine hohe Ionenausbeute und damit ein hohe Empfindlichkeit liefern, um mit eingesetzten Probenmengen von nur wenigen Femtomol arbeiten zu können.

Erfindungsgedanke

Die Matrixsubstanz muß gegenwärtig folgende vier getrennte Aufgaben gleichzeitig erfüllen, wobei stets nur ein gewisser Kompromiß erreicht werden kann:

- (1) sie muß die Analytmoleküle einzeln (nicht als Cluster) in ihre Kristalle aufnehmen und über das Aufwachsen der Kristalle auf dem Probenträger festhalten;
- (2) sie muß das Licht der Laserstrahlung effektiv absorbieren und so in kürzester Zeit genügend Energie für die momentane Verdampfung aufnehmen;
- (3) während der Verdampfung muß sie eine solch

hohe Plasmatemperatur erreichen, daß ein nicht zu kleiner Bruchteil der Moleküle ionisiert vorliegt, andererseits darf die Matrixsubstanz nicht — etwa durch Zersetzung — ihre zur Ionisierung befähigenden Eigenschaften verlieren; und
(4) sie muß dann im anschließenden Ionisierungsprozeß die großen Analytmoleküle durch Protonierung ionisieren.

Es ist nun ein Grundgedanke der Erfindung, diese vier Aufgaben, die die Matrixsubstanz zu erfüllen hat, auf (mindestens) zwei Substanzen aufzuteilen.

Eine Aufteilung des Aufgabenkatalogs auf zwei Substanzen kann nach diesem Grundgedanken der Erfindung etwa so aussehen:

- (a) eine erste Matrixsubstanz (ein sogenannter Binder) übernimmt die adsorptive Bindung der Analytmoleküle an einer vorzugsweise glatten Oberfläche, sie übernimmt die Bindung an die Unterlage, sie kann vorzugsweise die Energieabsorption übernehmen, und sie übernimmt insbesondere die Bildung der Plasmawolke;
- (b) eine zweite Matrixsubstanz (ein Ionisierer), die vorzugsweise molekular in der ersten Substanz gelöst ist, übernimmt die Ionisierung der Analytmoleküle in der Plasmawolke; sie kann auschilfweise auch die Energieabsorption übernehmen, wenn diese nicht von der ersten (oder von einer weiteren) Matrixsubstanz übernommen wird.

Es ist nun ein weiterer grundlegender Erfindungsgedanke, daß der Binder die Aufgabe der gleichmäßigen Bildung einer Plasmawolke am besten erfüllen kann, wenn er sich bei Laserlichtbeschuß explosiv in kleine Moleküle zersetzt. Als besonders vorteilhaft bieten sich hier Sprengstoffe wie beispielsweise Trinitrotoluol (TNT) an, die sich bei Erhitzung durch den Laserstrahl exotherm in die kleinen Moleküle Wasser, Kohlenmonoxid, Kohlendioxid, Stickstoff und Wasserstoff zersetzen.

Der Binder muß aber auch die Aufgabe der adsorptiven Bindung der Analytmoleküle übernehmen können. Es ist nun ein weiterer Erfindungsgedanke, hier hochadsorptive Polymerstrukturen zu benutzen, wie sie etwa aus Adsorptionssäulen zur Reinigung von hochmolekularen organischen Stoffen oder von Blotmembranen zum Blotzen 2D-elektrophoretischer Trennung bekannt sind.

Ein hervorragende Kombination einer hochadsorptiven, polymer strukturierten Substanz mit erwünschtem Sprengstoff-Charakter ist die Nitrozellulose (korrekter: Zellulosenitrat, Kurzzeichen nach DIN: CN), deren Explosivität sich darüber hinaus durch den Grad der Nitrierung einstellen läßt. Man spricht bei Stickstoffgehalten zwischen 10,5 und 12,5% von Zellulosedinitrat (Colloidiumwolke), bei solchen zwischen 12,5 und 14,14% von Zellulosetrinitraten (Schießbaumwolle). Beide Sorten verpuffen bei Erhitzung, die Verpuffungsheftigkeit nimmt mit höherer Nitrierung zu. Zellulosenitrate bestehen aus etwa 100 bis 3500 teil- bis voll-nitrierten Glukose-Einheiten.

Der Binder kann, muß aber nicht notwendig die Aufgabe der Lichtabsorption übernehmen. Diese Aufgabe kann durch eine Derivatisierung des Zellulosenitrats gelöst werden, wobei absorptive Molekülgruppen in das Zellulosegerüst eingebaut werden. Durch Wahl der Molekülgruppen kann man sich an die Wellenlänge des

verwendeten Lasers anpassen. — Es ist aber auch möglich, diese Aufgabe einer dritten Matrixsubstanz zu übertragen. Zellulosenitrat ist hervorragend farbbar, und kann somit für beliebige Wellenlängen undurchsichtig gemacht werden.

Es ist nun ein weiterer Gedanke der Erfindung, das Zellulosenitrat in Azeton gelöst als Lackschicht auf den Probenträger aufzubringen. Damit wird eine gleichmäßige Schicht erzeugt, die Grundvoraussetzung für die Automatisierbarkeit der Probenvorbereitung und der Ionisierung ist. Aus Zellulosenitrat werden technisch die Nitrolacke hergestellt. Nitrolacke verwenden meist das weniger nitrierte Zellulosedinitrat als Grundstoff.

Die Zellulosegrundstruktur ist besonders günstig für die oberflächliche Bindung der Analytmoleküle wegen ihrer besonders starken Adsorptivität. Da Nitrozellulose nicht in Wasser lösbar ist, kann man Proteine, wasserlösliche Polymere und andere großmolekulare Analytsubstanzen sehr einfach aus wässriger Lösung auf die Lackschicht aufbringen. Nitrozellulose wird häufig für Blotmembranen verwendet; sie hat gegenüber anderen, meist teureren Blotmembranen den Nachteil, daß die Analytmoleküle sehr fest, für viele Untersuchungsmethoden zu fest, an der Oberfläche haften. Dieser Nachteil ist im vorliegenden Fall ein Vorteil. Die wässrige Lösung von hochmolekularen Analytsubstanzen wie Proteinen enthält neben den Analytmolekülen häufig noch stabilisierende Puffersalze und andere für den Ionisierungsprozeß schädliche Bestandteile. Die feste Haftung der Analytmoleküle und die Wasserunlöslichkeit der Nitrozellulose ermöglicht ein leichtes und verlustarmes Waschen der aufgetragenen großmolekularen Analytsubstanz.

Sprengstoffe mit ihrer exothermen Zersetzung führen auch gleichzeitig zu einer sehr konstanten Wolkenbildung; kleinere Energieunterschiede im Laserlichtstrahl spielen eine untergeordnete Rolle. Der Sprengstoff wird dabei so dünn aufgetragen (teilweise nur Bruchteile eines Mikrometers), daß ein selbständiges Nachbrennen in Nachbarbereiche unterbleibt, da der Probenträger stark kühlt und die Verbrennung löscht. Im Gegensatz zu normalem MALDI, bei dem man Laserlichtfokusbereich von 100 bis 200 Mikrometer bevorzugt, um großflächig eine dünne Schicht der Matrixoberfläche abzutragen, kann man bei Sprengstoff-MALDI mit Fokusbereich von 3 bis 10 Mikrometern arbeiten. Es wird dabei innerhalb dieses Durchmessers die gesamte Schicht bis auf den Probenträger darunter abgetragen.

Das Aufbringen der Analytmoleküle auf die Oberfläche der Lackschicht hat den weiteren Vorteil, daß die so gebildeten Ionen der Analytmoleküle nach Ausdehnung der Wolke eine weit geringere Streuung ihrer Anfangsgeschwindigkeiten zeigen. Die Ionen lassen sich daher viel besser in Speicherzellen von ionenspeichernden Massenspektrometern fangen.

Für bestimmte Anwendungen ist allerdings die adsorptiv auf der Oberfläche bindbare Menge der Analytmoleküle zu klein. Es ist nun ein weiterer Gedanke der Erfindung, die Oberfläche der Schicht durch besondere Maßnahmen zu erhöhen, um die Aufnahmefähigkeiten für große Moleküle zu vergrößern. Dazu gibt es verschiedene Methoden. Die dünne Lackschicht kann man beispielsweise durch geeignete Lösungsmittel (beispielsweise durch ein Wasser-Alkohol-Gemisch) aufquellen lassen. Der Quellprozeß ist langsam und braucht mehrere Tage. Es bildet sich dabei ein gerüstartiges Gel mit kavernenartigen Höhlen. Durch vorsichtiges Ein-

trocknen (beispielsweise durch Gefriertrocknen) läßt sich dann eine hochporöse Schicht erzeugen, die wegen ihrer großen Oberfläche eine höhere Menge (ein vielfaches) der Analytsubstanz aufnehmen kann.

Um die aufgetragene Schicht auch gegen nicht-wässrige Lösungsmittel unlöslich zu machen, ist es besonders vorteilhaft, die meist fadenförmigen Moleküle der Lackschicht nach Aufbringen auf den Probenträger durch Zugabe eines Brückenbildners zu vernetzen. Für die Vernetzung von Zellulosenitrat hat sich Diisocyanat bewährt, das die restlichen OH-Gruppen benachbarter Molekülstränge miteinander verbindet. Diese Vernetzung unterbindet die Lösbarkeit, nicht aber die Quellbarkeit. Die Vernetzung unterbindet nicht die Zersetzlichkeit des Zellulosenitrats unter Einwirkung der Laserstrahlung.

Eine andere Methode geht von hochporösem, sehr feinem Pulver von Zellulosenitrat aus, das auf den Probenträger aufgebracht wird. Das kann beispielsweise durch Bestauben einer Klebstoffschicht geschehen, wobei die Klebstoffschicht beispielsweise wiederum auf der Basis von Zellulosenitrat aufgebaut sein kann.

Eine poröse Schicht auf einem elektrisch leitenden Probenträger kann beispielsweise auch direkt zum Blotting eines durch 2-dimensionale Gel-Elektrophorese aufgetrennten Substanzgemischs benutzt werden. Die 2-dimensionale Abtastung durch MALDI ergibt eine Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber üblichen Färbungsmethoden, die bei mehreren Zehnerpotenzen liegt und darüberhinaus zuverlässige Information über das Molekulargewicht bietet.

Der zweite Matrixbestandteil, der Ionisierer, kann nun entsprechend den Bedürfnissen ausgesucht werden. Im allgemeinen ist es seine einzige Aufgabe, die Analytmoleküle zu ionisieren. Der Ionisierer soll sich im Lack des Binders lösen können. Wird beispielsweise Azeton als Lösungsmittel für den Binder zur Herstellung des Lackes benutzt, so soll sich auch der Ionisierer in Azeton lösen.

Es hat sich experimentell erwiesen, daß die Konzentration des Ionisierers nicht hoch zu sein braucht. Unsere Versuche haben sich allerdings auf Alpha-Cyano-4-Hydroxi-Zimtsäure (kurz "Alpha-Cyano") beschränkt. Mit etwa 10% Alpha-Cyano in 90% Nitrozellulose erhält man einen nahezu klaren Lack, der sich sehr dünn aufbringen läßt. Er bildet eine gute Grundlage für die Ionisierung von praktisch allen Arten von Proteinen, die leicht aus wässriger Lösung auf die Oberfläche des wasserunlöslichen Lacks aufgebracht werden können.

Es ist jedoch zu erwarten, daß die Suche nach besseren Ionisierern bald Ergebnisse liefern wird, die die Ausbeute an Analytionen, die jetzt etwa bei 1/10000 liegt, ganz wesentlich erhöhen werden.

Wenn wir vom Blotting absehen, so werden die Analytmoleküle meist einfach durch Aufbringen eines winzigen Tröpfchens der Analytlösung auf die adsorptive Schicht aufgebracht. Das Tröpfchen muß oft nicht einmal eintrocknen, nach Adsorption der Analytmoleküle kann der Rest einfach abgewaschen werden. Das ist besonders vorteilhaft, da so auch störende Puffersubstanzen und Salze der Lösung entfernt werden können.

Für hochverdünnte Analytlösungen, bei denen ein aufgetragener Tropfen nicht genügend Moleküle für eine massenspektrometrische Untersuchung enthält, hat sich eine andere Art der Probenträger bewährt. Die adsorptive Matrixschicht wird auf die Oberfläche von winzigen magnetischen Kügelchen ("magnetic beads") aufgebracht. Besonders vorteilhaft ist es hier, die Ma-

trixschicht durch Vernetzung vollkommen unlöslich zu machen. Die Kügelchen werden dann in kleiner Anzahl der sehr verdünnten Analytlösung beigegeben. Durch langandauernden und bewegten Kontakt können so die Analytmoleküle praktisch quantitativ adsorptiv an die Oberfläche der Kügelchen gebunden werden. Die Kügelchen lassen sich anschließend durch magnetische Spezialwerkzeuge aus der Lösung herausheben und auf eine flache Probenenträgerunterlage bringen. Dort können sie durch magnetische Kräfte, durch übergelegte Feinstgitter oder aber einfach durch Ankleben befestigt werden. Sie werden, nach Überführung ins Vakuum, direkt vom Laser beschossen und liefern ein hervorragendes MALDI.

Die Kügelchen sind besonders effektiv einsetzbar, wenn nur geringste Mengen an Analytsubstanz vorliegen, weil sie die Analytmoleküle praktisch vollständig auch aus sehr verdünnten Lösungen oder aus kleinsten Volumina adsorbieren können. Dabei braucht die Lösung nicht pipettiert oder sonstwie transportiert werden, und es werden solchermaßen die Verluste durch Wandadsorptionen so gering wie möglich gehalten. Es lassen sich in dieser Weise sogar Analytsubstanzen aus einzelnen biologischen Zellen einer massenspektrometrischen Analyse zuführen.

Das bisher verwendete MALDI-Verfahren verlangte notwendigerweise eine Bestrahlung des Probenträgers von der Probenseite her, da jeweils nur eine sehr geringe Matrixmenge an der Oberfläche verdampft wurde, also jeweils nur ein Bruchteil der Schichtdicke abgetragen wurde. Auch die Verwendung von magnetischen Kügelchen verlangt einen Beschuss von der Probenseite her, da die Kügelchen undurchsichtig sind.

Werden jedoch flache Probenträger benutzt, so kann ein anderes Verfahren verwendet werden, da die Verwendung einer dünnen Sprengstofflackschicht zu einer vollständigen Verdampfung eines kleinen Schichtbereiches führt, so daß eine nackte Stelle des Probenträgers übrigbleibt. Es ist daher ein weiterer Gedanke der Erfindung, die Matrixschicht von der Rückseite eines für die Laserstrahlung durchsichtigen Probenträgers her zu bestrahlen und so zu verdampfen. Die Rückseite des Probenträgers ist viel leichter zugänglich als die Vorderseite, auf der die Beschleunigungs- und Fokussierungsblenden mit ihren hohen Spannungen einem senkrechten Aufschuß oder einem Aufschuß mit kurzer Brennweite im Wege stehen und sehr trickreiche Konstruktionen notwendig machen.

Da der Fokusedurchmesser sehr viel kleiner sein kann als bei normalem MALDI, kann auch die Leistung des Lasers sehr viel geringer sein. Gegenüber heute allgemein verwendeten Gaslasern kann die gesamte Strahlungsenergie entsprechend der verringerten Fläche um einen Faktor 100 bis 1000 kleiner sein. Es können daher sehr viel schwächere Lasersysteme verwendet werden. Es ist daher ein weiterer Gedanke dieser Erfindung, einfache Diodenpulslaser zu benutzen, wie sie etwa bei beschreibbaren Compact Disks (CD) verwendet werden. Bei Verwendung von durchsichtigen Probenträgern läßt sich ein solcher Diodenpulslaser sehr leicht rückwärtig zum Probenträger installieren.

Durch die Verwendung von Diodenpulslasern auf der Rückseite des Probenträgers ergeben sich weitere Vorteile. Erstens kann so die Linse, die zur Fokussierung benutzt wird, nicht verschmutzt werden. Zweitens kann eine Linse sehr kurzer Brennweite eingesetzt werden, wodurch sich auch bei mäßiger Strahlqualität des Diodenlasers ein sehr kleiner Brennfleck ergibt.

Auf die Wellenlänge des Lasers, die bei bisherigen MALDI-Verfahren immer sehr wichtig war und die Auswahl der Matrixsubstanzen mit bestimmt hat, kommt es nur noch in zweiter Linie an, da es der einzige Zweck der Laserstrahlung ist, den Sprengstoff zu zünden.

Beschreibung der Figur

Fig. 1 zeigt eine Anordnung mit einer Lackschicht 4 aus Zellulosenitrat mit 10% Alpha-Cyano-4-Hydroxi-Zimtsäure auf einem beweglichen Probenträger 3, der für die Laserlichtstrahlung 7 aus einem Diodenlaser 1 durchsichtig ist. Eine Linse 2 erzeugt an der Stelle 5 einen Fokus, der trotz-mangelhafter Strahlqualität einen Durchmesser von nur etwa 10 Mikrometer hat. An dieser Stelle verpufft das Zellulosenitrat und bildet eine Wolke aus niedermolekularen Substanzen mit einem Anteil an ionisiertem Alpha-Cyno. In der Dampf Wolke wird die oberflächlich auf die Lackschicht 4 aufgebrachte monomolekulare Schicht aus Analytmolekülen durch Ionen der Matrixsubstanz Alpha-Cyano ionisiert. An den Stellen 6 sind in vorausgehenden Verfahrensschritten bereits Teile der Matrixschicht entfernt worden.

Besonders günstige Ausführungsformen

Die Grundaussführung des Verfahrens nach dieser Erfindung ist in Fig. 1 gezeigt. Ein Laserlichtpuls von etwa 5 Nanosekunden Dauer aus einem Diodenpulslaser 1 wird vermittelt der Linse 2 durch den durchsichtigen Probenträger 3 hindurch auf die Matrixschicht 4 fokussiert. Diese Matrixlackschicht 4 besteht aus Zellulosenitrat mit 10% Alpha-Cyano-4-Hydroxi-Zimtsäure, sie ist nur etwa 0,5 Mikrometer dick. Der Fokusedurchmesser im Brennpunkt 5 beträgt wegen der unvermeidlichen Strahlfehler etwa 10 Mikrometer. Ein Teil des Laserlichtes wird von der Matrixschicht 4 absorbiert und führt zur Verpuffung des Zellulosenitrats, ein weiterer kleiner Teil 7 des Laserlichts tritt hindurch und verschwindet. Die durch die Verpuffung des Zellulosenitrats erzeugte Wolke aus niedermolekularen Gasen enthält auch die vereinzelt Moleküle der Protonierungssubstanz Alpha-Cyano-4-Hydroxi-Zimtsäure, die zum Teil wegen der hohen Plasmatemperatur ionisiert vorliegen. Diese Ionen reagieren mit den ebenfalls vereinzelt Molekülen der Analytsubstanz und protonieren diese. Die Analytionen werden in üblicher Weise dem Massenspektrometer zur Analyse zugeführt.

Der Probenträger ist parallel zu seiner Oberfläche beweglich und kann durch eine nicht gezeigte Bewegungsvorrichtung verschoben werden. Die Löcher 6 in der Matrixschicht sind in vorausgegangenen Analysenzyklen erzeugte Brennflecke, in denen die Matrixschicht vollständig verpufft ist. Die Meßwerte aus diesen vorausgegangenen Analysenzyklen werden gewöhnlich in einen Digitalspeicher addiert und liefern nach einigen Zyklen ein Massenspektrum mit verbessertem Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

Eines der aussagekräftigsten Ergebnisse einer massenspektrometrischen Analyse ist das Molekulargewicht der untersuchten Analytsubstanz. Reduziert sich die analytische Aufgabe auf die Bestimmung des Molekulargewichts, so reichen (bei gutem Massenauflosungsvermögen) im Minimum dafür etwa 100 Ionen, die am Detektor gemessen werden und bereits einen signifikanten Massenpeak ergeben. Nimmt man einmal an, daß man nur ein fünftel der auf die Lackschicht aufge-

brachten Analytmoleküle nutzen kann, und rechnet man vorsichtig mit einer Ionenausbeute von nur 1/10 000 gemessenen Ionen pro eingesetztem Analytmolekül, so braucht man etwa 5 000 000 Moleküle der Analytsub-
 stanz für diese Bestimmung des Molekulargewichts. 5
 Bringt man die Analytmoleküle in einem Fleck der Größe von 100 mal 100 Mikrometer unter, so ergibt das einen Bedeckungsgrad zwischen 1/100 und 1/1000 einer monomolekularen Schicht. Die eingesetzte Menge entspricht dabei etwa 10 Attomol an Analytsubstan- 10
 z. Die Analyse braucht etwa 20 bis 40 Laserlichtschüsse von jeweils etwa 10 Mikrometer Laserlichtfokussdurchmesser. Die gesamte Aufnahmedauer beträgt bei 20 Laserlichtschüssen pro Sekunde nur etwa ein bis zwei Sekunden. — Diese Werte entsprechen einer unteren Grenze. 15
 Für die Routineanalytik muß man mit dem zehn- bis hundertfachen Substanzeinsatz rechnen, also mit etwa 100 Attomol bis 1 Femtomol. Das gilt aber nur unter der Voraussetzung, daß es nicht gelingt, die Ionisierungsausbeute zu erhöhen, beispielsweise durch die Entdek- 20
 kung einer geeigneteren Ionisierungssubstanz, deren Einsatz durch diese Erfindung ermöglicht wird.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von Ionen großmolekularer Analytsubstanzen, die sich im Vakuum auf einem Probensträger befinden, durch eine laserinduzierte Desorption, die von einer ebenfalls auf dem Probensträger befindlichen Matrixsubstanz unter- 30
 stützt wird (MALDI), dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixsubstanz aus mindestens zwei Komponenten besteht, von denen eine Komponente durch die Einwirkung der Laserstrahlung zersetzt wird. 35
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine weitere, leicht protonenabgebende Matrixkomponente die Ionisierung der Analytmoleküle übernimmt.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine weitere Komponente die Matrix färbt und für das verwendete Laserlicht absorptiv macht.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die durch die Laserstrahlung zersetzbare Substanz ein Sprengstoff oder eine sprengstoffähnliche Substanz mit exothermer Energiebilanz des Zersetzungsprozesses ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß Zellulosenitrat als zersetzbare Sub- 50
 stanz verwendet wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß Zellulosenitrat mit einem optimalen Nitrierungsgrad zwischen 11,5 und 13,5% Stickstoff verwendet wird. 55
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixkomponenten eine feste, gegenseitige Lösung bilden.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrixkomponenten gemeinsam als Lackschicht aufgebracht werden. 60
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Lackschicht nach Aufbringen auf den Probensträger durch einen Brückenbildner dreidimensional vernetzt und dadurch unlöslich gemacht wird. 65

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß Diisocyanat als Brückenbildner verwendet wird.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Lackschicht durch Quellen und Trocknen in eine hochporöse Schicht umgewandelt wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß Zellulosenitrat als hochporöses Pulver in einer dünnen Schicht auf den Probensträger aufgebracht wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Analytmoleküle durch Adsorption aus einer Lösung auf die Oberfläche der soliden oder porösen Schicht aufgebracht werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Analytmoleküle durch Blotten auf die poröse Schicht aufgebracht werden.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Probensträger für die verwendete Wellenlänge des Lasers durchsichtig ist und die Laserstrahlung von der Rückseite des Probensträgers eingestrahlt wird.

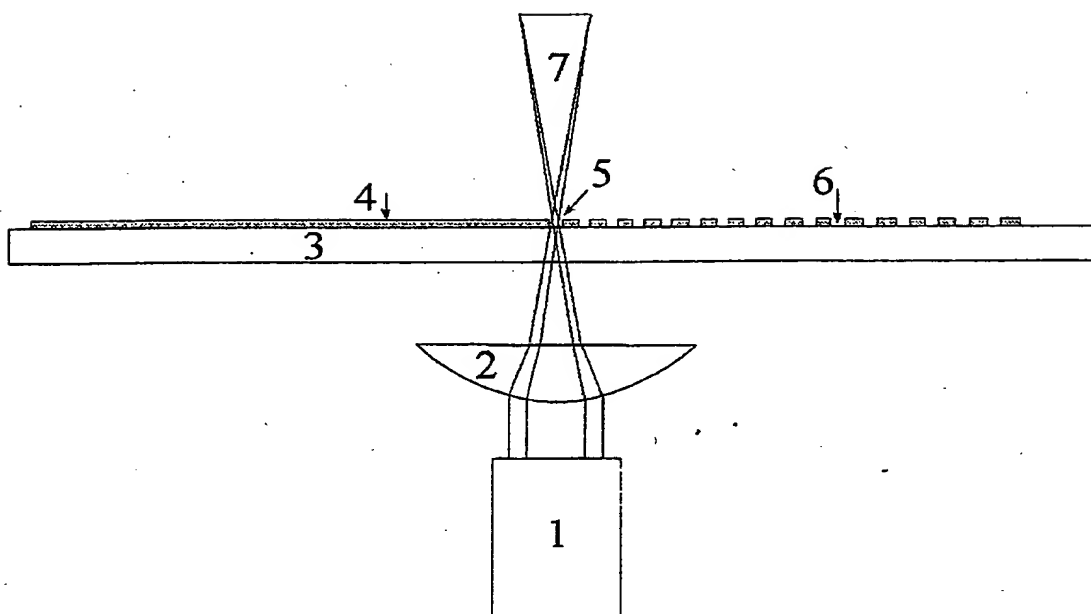
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein Diodenpulslaser für die Laserdesorption verwendet wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß kleine magnetische Kügelchen (magnetic beads) als Probensträger benutzt werden.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die magnetischen Kügelchen zur adsorptiven Beladung mit Analytmolekülen in eine Lösung der Analytmoleküle gegeben, durch ein Magnetfeld herausgefischt, auf eine Probensträgergrundplatte aufgebracht, und daß dann die auf ihrer Oberfläche befindlichen Analytmoleküle durch Laserbeschuß zur Desorption gebracht werden.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



Figur 1